

PCT/CN03/00217

证 明

REC'D 28 MAY 2003
WIPO PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 03 26

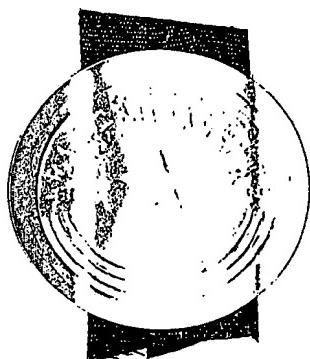
申 请 号： 02 1 16259.X

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 以 E R B B - 3 为基础的用于肿瘤治疗的方法和组合物

申 请 人： 上海泽生科技开发有限公司

发明人或设计人： 周明东



PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 4 月 15 日

权 利 要 求 书

1. 一种预防、治疗或延缓哺乳动物肿瘤的方法，该方法包括对需要或希望这种预防、治疗或延缓的哺乳动物施用有效量的 ErbB-3 蛋白或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸或其功能片段，产生抗所述肿瘤的免疫反应，因而所述肿瘤得以预防、治疗或延缓。
2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的哺乳动物是人类。
3. 权利要求 1 所述的方法，其中施用有效量的 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域的核酸，或其功能片段。
4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 ErbB-3 蛋白包括 SEQ ID NO:1 中所述的氨基酸序列。
5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中所述的氨基酸序列。
6. 权利要求 1 所述的方法，进一步包括给哺乳动物施用免疫反应增强剂。
7. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段是原位用于肿瘤。
8. 权利要求 7 所述的方法，进一步包括对肿瘤原位使用免疫反应增强剂。
9. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段是与药学上可接受的载体和赋形剂共同使用的。

10. 权利要求 1 所述的方法，其中所述 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段是与抗肿瘤药剂共同使用的。

11. 权利要求 10 所述的方法，其中所述抗肿瘤药剂选自：抗血管生成剂、烷化剂、抗代谢剂、一种自然产品、铂配位络合物、蒽二酮、取代尿素、甲肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素、拮抗剂、癌基因抑制剂、肿瘤抑制子基因或蛋白、抗肿瘤基因抗体、抗肿瘤基因反义寡聚核苷酸、抗癌细胞表面抗原抗体和其它抗肿瘤疫苗。

12. 权利要求 1 所述的方法，其中被预防、治疗或延缓的肿瘤选自：肾上腺、肛门、听觉神经、胆小管、膀胱、骨、脑、乳房、bruccal、中枢神经系统、宫颈、结肠、耳、子宫内膜、食管、眼睛、眼睑、输卵管、胃肠道、头颈部、心脏、肾、喉、肝、肺、下颚、下颚外侧髁、上颌骨、嘴、鼻咽、鼻子、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、阴茎、耳廓、垂体、前列腺、直肠、视网膜、唾液腺、皮肤、小肠、脊髓、胃、睾丸、甲状腺、扁桃腺、尿道、阴道、耳蜗前庭神经和阴户肿瘤。

13. 权利要求 1 所述的方法，其中被预防、治疗或延缓的肿瘤选自：乳房、卵巢、胃、前列腺、结肠和肺部癌症。

14. 权利要求 1 所述的方法，其中被预防、治疗或延缓的肿瘤是乳腺癌。

15. 分离的核酸片段，该分离的核酸片段包括编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的核苷酸序列，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中所述的氨基酸序列。

16. 权利要求 15 所述的分离的核酸片段，其中所述核酸是 DNA。

17. 权利要求 15 所述的分离的核酸片段，其中所述核酸是 RNA。
18. 一种质粒，该质粒包括权利要求 16 所述的核酸片段。
19. 一种细胞，该细胞包括权利要求 18 所述的质粒。
20. 权利要求 19 所述的细胞，其选自细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、植物细胞、昆虫细胞、动物细胞和人细胞。
21. 一种产生 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的方法，该方法包括在细胞表达 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的条件下培养权利要求 19 所述的细胞以及回收表达的 ErbB-3 蛋白胞外结构域，或其功能片段。
22. 一种基本上纯化的蛋白或肽，该蛋白或肽包括 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中所述的氨基酸序列。
23. 一种偶联物，该偶联物包括：
- a) 一种蛋白或肽，包括 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中所述的氨基酸序列；和
 - b) 一种与 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段直接或通过接头连接的促进剂，其中所述促进剂有助于：
 - i) 亲和分离或纯化偶联物；
 - ii) 将偶联物吸附到表面上；或
 - iii) 检测偶联物。
24. 权利要求 23 所述的偶联物，其是一种融合蛋白。
25. 权利要求 24 所述的偶联物，其中当所述偶联物是一种融合蛋白时，促进剂还可以是 i) 在细胞内合成后的亚细胞定位序列； ii) 增

强免疫原性的序列；或 iii) 其它蛋白类的肿瘤抗原。

26. 一种药物组合物，该组合物包括权利要求 15 所述的分离的核酸片段和药学上可接受的载体和赋形剂。

27. 权利要求 26 所述的药物组合物，进一步包括免疫反应增强剂和/或抗肿瘤药剂。

28. 一种药物组合物，该组合物包括权利要求 22 所述的基本上纯化的蛋白或肽和药学上可接受的载体和赋形剂。

29. 权利要求 28 所述的药物组合物，进一步包括免疫反应增强剂和/或抗肿瘤药剂。

30. 一种抗体，该抗体与 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段的一个抗原决定部位结合，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中表示的氨基酸序列。

31. 权利要求 30 所述的抗体，其是多克隆抗体或单克隆抗体。

32. 权利要求 30 所述的抗体，其是人抗体或人源化抗体。

33. 一种药物组合物，该组合物包括权利要求 30 所述抗体和药学上可接受的载体和赋形剂。

34. 权利要求 33 所述的药物组合物，进一步包括一种抗肿瘤药剂。

35. 一种疫苗，该疫苗包括权利要求 15 所述的分离的核酸片段。

36. 权利要求 35 所述的疫苗，进一步包括免疫反应增强剂。

37. 一种疫苗，该疫苗包括权利要求 22 中所述的基本上纯化的蛋

白或肽。

38. 权利要求 37 所述的疫苗，进一步包括免疫反应增强剂。

39. 一种试剂盒，该试剂盒包括置于容器中的权利要求 15 所述的分离的核酸片段和该分离的核酸片段用于肿瘤预防、治疗和延缓的使用说明。

40. 一种试剂盒，该试剂盒包括置于容器中的权利要求 22 中所述的基本上纯化的蛋白或肽和该基本上纯化的蛋白或肽用于肿瘤预防、治疗和延缓的使用说明。

41. 一种结合物，该结合物包括权利要求 15 所述的分离的核酸片段和抗肿瘤药剂。

42. 权利要求 41 所述的结合物，进一步包括药学上可接受的载体和赋形剂。

43. 一种结合物，该结合物包括权利要求 22 所述的基本上纯化的蛋白或肽和抗肿瘤药剂。

44. 权利要求 43 所述的结合物，进一步包括药学上可接受的载体和赋形剂。

说 明 书

以 ERBB-3 为基础的用于肿瘤治疗的方法和组合物

技术领域

本发明涉及用于治疗哺乳动物，特别是人类肿瘤的组合物和方法。更具体地说，是本发明提供了一种用 ErbB-3 蛋白、编码 ErbB-3 蛋白的核酸或是其的功能片段预防、治疗或延缓哺乳动物肿瘤的方法。本发明也提供了分离编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域的核酸，或其功能片段，基本上纯化的 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段以及能与 ErbB-3 蛋白的胞外结构域的一个抗原决定部位结合的抗体，或其功能片段。本发明进一步提供了包括 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段或者编码该胞外蛋白的核酸和与该胞外蛋白结合的抗体或它们的功能片段的药物组合物或/和疫苗。

背景技术

癌症是导致人类死亡的主要疾病，它由生理性失控的细胞增殖引起。生理性失控的细胞增殖影响了人体的正常生理状态，导致严重的病理反应，经常导致死亡。虽然人类在癌症研究和治疗方面做出了极大的努力，但目前癌症仍然是人类死亡的主要原因。现在存在多种治疗癌症病人的方法，包括手术、放疗和化疗。由于前两种方法，即手术与放疗不能完全消灭病人体内的癌细胞，因此后者，即化疗与其他方法结合或单独地普遍用于控制癌细胞的生长。用于病人的抗癌化合物通常是靶向阻止癌细胞增殖或杀死分裂细胞。

当化合物对癌细胞有毒时，它们通常也严重地影响那些对人的生命而言必需的正常的分裂细胞。因此，癌症研究的一个主要方向就是寻找能专一性妨碍癌细胞或杀死癌细胞而不影响正常细胞增殖的方法。当前非常需要这样一种用于癌症病人的治疗方法。

ErbBs 属于第一类受体蛋白酪氨酸激酶。ErbB 介导的细胞信号对胚胎发育和成熟器官功能起到关键性作用。在细胞水平上，ErbB 受体介导了细胞增殖、分化、迁移和细胞结构再组织的信号。存在四种结

构相似的 ErbB 蛋白，即 ErbB-1、ErbB-2、ErbB-3 和 ErbB-4。表皮生长因子（EGF）是能识别并结合上 ErbB-1 的几种配体之一。ErbB-3 和 ErbB-4 也能与几种配体结合，包括神经调节蛋白-1（NRG-1）。ErbB-2 的配体至今还没有发现。然而，ErbB-2 是作为能和 ErbB-3、ErbB-4 或 ErbB-1 形成异源二聚体的成分以及在神经调节蛋白-1（NRG-1）激活的细胞信号传导中起关键作用。

基因定位实验的体内研究表明 ErbB-2 基因失活造成了和神经调节蛋白-1（NRG-1）基因失活同样的动物体发育缺陷。这两种动物都在颅神经节和心脏小梁发育中表现出缺陷。而且，ErbB-3 或 ErbB-4 基因失活的小鼠具有与敲除了神经调节蛋白-1（NRG-1）或 ErbB-2 基因的小鼠相似或重叠的表现型。这些数据说明了 ErbB-2、ErbB-3 和 ErbB-4 都是在 NRG-1 激活的信号链中。

除了在发育中起作用外，人 ErbB-2 基因经常在多种类型人体肿瘤中扩增并导致其编码的 ErbB-2 蛋白过量表达。有关 ErbB-2 的早期研究发现导致形成 ErbB-2 同源二聚体的癌基因点突变反过来能在细胞内结构域的酪氨酸残基上引起显著的磷酸化。虽然在 ErbB-2 基因过量表达的人体肿瘤中没有发现相应的点突变个体，但是 ErbB-2 的增量调节导致了同源二聚体的形成，这也增加了其细胞内结构域的酪氨酸残基磷酸化。这个过程被假设是一个触发细胞转化或生长的信号级联放大的起点，因而启动了肿瘤发生。然而，存在推翻 ErbB-2 同源二聚体启动了肿瘤发生的假设的证据：i) 一些通过基因工程的方法提高二聚体和自身磷酸化程度的 ErbB-2 突变体对细胞转化没有影响。ii) 某些与 ErbB-2 的胞外结构域结合设想促进同源二聚体形成的抗体导致 ErbB-2 表达的肿瘤细胞的生长促进效应，而其他则阻止肿瘤细胞的生长。这些资料表明 ErbB-2 的同源二聚体化不足以产生细胞生长促癌作用或细胞转化，其他条件，可能涉及特定二聚体方向或构象，是必须的。

ErbB-2 作为与 ErbB-3 或 ErbB-4 受体结合的异源二聚体配体的一部分而起作用。配体，神经调节蛋白-1（NRG-1），以被发现具有两个独立的受体结合位点：一个与 ErbB-3 或 ErbB-4 有较高的亲和性，另一个具有对所有 ErbB 蛋白较低不专一的亲和性。所以，表达 ErbB-3

或 ErbB-4 和 ErbB-2 的细胞受到 NRG-1 影响时会导致 ErbB-3 或 ErbB-4 和 ErbB-2 形成的异源二聚体。但是，在无配体时，ErbB-2 是否对其他 ErbB 蛋白具有亲和性是不清楚的并且那样的相互作用可能涉及肿瘤发生。在所有的 ErbB 蛋白的受体中，ErbB-3 是独一无二的，因为： i) ErbB-2 较易和 ErbB-3 形成异源二聚体； ii) 当用 ErbB-2 和 ErbB-3 同时转化细胞 NIH3T3 时获得的转化率比用 ErbB-2 单独转化要高； iii) 在与 ErbB-2 过量表达相关的乳腺癌细胞里，ErbB-3 也表现出高表达； iv) ErbB-3 在来自 ErbB-2 转基因小鼠的 ErbB-2 过量表达的肿瘤细胞里也获得过量表达。

许多专利和专利申请公开了与肿瘤或癌症治疗相关的 ErbB-2 和/或 ErbB-3。举例而言，WO 00/78347 公开了阻止或抑制细胞生长，尤其是癌细胞生长的方法，该方法包括阻止或减少 ErbB-2/ErbB-3 的异源二聚体的形成或干扰细胞中 ErbB-2/ErbB-3 的异源二聚体的构象，和阻止或减少 ErbB-2/ErbB-3 的异源二聚体的形成或干扰细胞中 ErbB-2/ErbB-3 的异源二聚体的构象的药剂，从而达到阻止或抑制细胞生长。美国专利 No.5,578,482 涉及 ErbB-2 配体和其功能性衍生物，这些物质具备与 erbB-2 基因产品结合的特性。美国专利 No.5,820,859 涉及寻找一种用于治疗表达 erbB-3 受体药剂的方法。美国专利 No.5,968,511 涉及 ErbB-3 抗体。

在本技术领域，存在对与肿瘤治疗相关的更有效的和/或更高性价比的 ErbB-3 的需求。本发明涉及本技术领域的这一方面和其他相关需求。

在该发明之前，本发明人已有一项发明（中国专利申请号 00137771.X）提出 erbB-3 为新的抗癌靶标，发明人研究发现 ErbB-2/ErbB-3 所形成的异二聚体是肿瘤发生发展的主要机制。本项申请的发明者系统地研究了应用基因工程表达的 ErbB-3 蛋白抗原：DE3-1 为大肠杆菌表达蛋白；B3 为真核细胞表达蛋白的抗原片段对特定的肿瘤作为肿瘤疫苗在预防和治疗人类乳腺癌等癌症中的作用及方法。

发明内容

在一个方面，本发明涉及预防、治疗和延缓哺乳动物体肿瘤的方

法。本方法包括给哺乳动物动物服用达到预防、治疗或延缓肿瘤所需的或适当的，有效量的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段，从而产生抗所述肿瘤的免疫反应，进而所述肿瘤得以预防、治疗或延缓。

在另一个方面，本发明涉及分离的核酸片段，该分离的核酸片段包括编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的核苷酸序列，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段包括 SEQ ID NO:2(图 5)或 SEQ ID NO:3(图 11)中所述的氨基酸序列。

在另一个方面，本发明涉及基本上纯化的蛋白质或肽，其包括 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所述的氨基酸序列。

在另一个方面，本发明涉及一种偶联物，该偶联物包括：a)包含 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段的蛋白质或肽，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所述的氨基酸序列；b)与 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段直接或通过接头连接的促进剂，其中促进剂有助于：i) 亲和分离或纯化偶联物；ii) 将偶联物吸附到表面上；或iii) 检测偶联物。

在另一个方面，本发明涉及一种抗体，该抗体与 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段的一个抗原决定部位的结合。该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所述的氨基酸序列。

本发明还提供了包含 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段，或编码的核酸和与该胞外结构域结合的抗体及其功能片段的药物组合物和/或疫苗。

附图简述

图 1 表示 B3 cDNA 序列 (SEQ ID NO:4)。

图 2 说明 B3 质粒的限制性酶消化情况。泳道 1: 1kb 序列梯(NEB). 泳道 2-9: 用 BamHI/XbaI 对 DNA 进行鉴定性消化。除了泳道 5 上的克隆外，所有其他克隆均为正确克隆。泳道 10: 用 BamHI/XbaI 对 pCDNA3 载体进行单独消化。

图 3 说明 B3 质粒的构建。

图 4 说明分离和/或纯化以及 SDS-PAGE 分析 B3 蛋白。泳道 1-4: BSA 对照, 每泳道相应的加样量是 10ug, 5ug, 3ug, 1ug。泳道 5: 蛋白质标准, 7708S, NEB。泳道 6-7: COS7 诱导的 B3 蛋白表达。

图 5 表示 B3 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。

图 6 表示 DE3-1 cDNA 序列(SEQ ID NO:5)。

图 7 表示 DE3-1 质粒的构建。

图 8 说明 DE3-1 质粒的限制性内切酶消化情况。泳道 1: 用 BamHI/XhoI 消化重组了 DE3-1 的 pGEX4T-1。泳道 2: 用 BamHI/XhoI 消化重组了 DE3-1 的 pET32a。泳道 3: 1kb 序列梯(NEB)。

图 9 说明 DE3-1 表达的 SDS-PAGE 分析结果。泳道 1: 诱导前。泳道 2: 诱导后。泳道 3: 包涵体。泳道 4: 超声处理后的上清。

图 10 说明 DE3-1 蛋白的分离和/或纯化以及 SDS-PAGE 分析。泳道 1: 全蛋白。泳道 2-8: 经过 NTA 组氨酸标记亲和层析柱的洗脱液。

图 11 表示 DE3-1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)

图 12 说明不同疫苗对 FVB/N 转基因小鼠的发病率的影响。

图 13 说明不同药物对小鼠肿瘤生长的影响 (5 周)。

图 14 说明不同药物对肿瘤生长的抑制率(5 周)。

图 15 说明 DE3-1 对小鼠乳腺癌生长的影响 (5 周)。

图 16 说明 DE3-1 对肿瘤生长的抑制率(5 周)。

图 17 说明 B2 和 B3 交叉免疫原性实验 (B3 蛋白包被)。

图 18 说明 B2 和 B3 交叉免疫原性实验 (B2 蛋白包被)。

本发明的实施方式

为了公开得清楚而不是为了进行限制, 对发明的详细描述分成下述小节。

A.释义

除非有另外的定义, 所有在此使用的技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技能人员普遍理解的同样含义。这里参考的所有专利、申请、公开的申请和其他出版物均被全部引入作为参考。如果本节阐述的定义与在此参考中的专利、申请、公开的申请和其他出

版物所阐述的定义相反或不一致时，本节阐述的定义胜过其他参考文献的定义。

在此所用，“一个”的意思是“至少一个”或“一个或多于一个”。

在此所用，“肿瘤”是指不正常的新的生长，所以包括良性和恶性肿瘤。不同于增生，在缺少原始刺激后，肿瘤增殖会继续进行。

在此所用，“癌症”是指由任何类型的恶性肿瘤所致的疾病的总称。

在此，“恶性的”用于肿瘤，是指原发性肿瘤，其具有转移的能力，即同时失去了生长控制和位置控制。

在此所用，“erb”指两种癌基因，erb A 和 erb B，与骨髓成红血细胞增多症病毒相关（一种急性的转化性逆转录病毒）。

在此所用，“免疫反应”是指响应于抗原的生物体免疫系统的效应变化；在脊椎动物体内，这个过程可能涉及抗体产生，诱导细胞介导的免疫性，补体激活或免疫球蛋白耐受性的形成。

在此所用，“免疫反应增强剂”是指在引起免疫反应中能增强抗原效应的物质。

在此所用，“疫苗”是指用于主动免疫预防的任何组合物。疫苗在治疗学上可以用于治疗疾病，或是预先或感染后阻止疾病的发展或是降低疾病的严重性。典型的疫苗包括，但不仅限于此，制备有毒菌株的死亡菌体或减毒菌株（变种或突变体）的活菌体，或者微生物、真菌、植物、原生动物或后生动物的衍生物或产品。“疫苗”也包括基于疫苗的蛋白质/肽和核酸/寡聚核苷酸。

在此所用，“抗肿瘤药剂（与抗癌药剂交换使用）”是指用于抗肿瘤治疗的任何药剂。这包括任何单独或与其他化合物混合使用能够减轻、减少、改善、预防或是维持在没有临床症状或与肿瘤相关的的诊断标志的药剂，并且这些药剂能用于在此提供的方法、联合使用和组合物中。抗肿瘤药剂包括，但不仅限于此，抗血管生成剂、烷化剂、抗代谢剂、某种自然产品、铂配位络合物、蒽二酮、取代尿素、甲肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、某种激素和拮抗剂、抗癌多聚糖和某种药草提取物例如中草药提取物。

在此所用，“抗肿瘤治疗”是指任何设计通过减轻或改善其症状的用于治疗肿瘤或癌症的治疗方法。预防肿瘤或癌症的发生或减轻其严

重程度的治疗也予以考虑。

在此所用，“抗肿瘤药剂（或抗癌药剂）或抗肿瘤治疗”不包括 ErbB-3 蛋白或其功能片段或是编码 ErbB-3 蛋白的核酸或其功能片段，或者将它们用于治疗，但是包括为具有本领域技术人员所知的某种方式改善肿瘤或癌症症状的所有药剂和治疗药征。

在此所用，“用于治疗特定疾病的化合物的有效用量”是指足以改善，或是以某种方式减少与该疾病相关的症状的用量。这样的用量可以作为单一剂量或者根据一个配方其可有效的服用剂量。这个用量可能治愈疾病，但是典型的情况是为了改善疾病症状而服用。为达到期望的症状改善，可能需要连续服用。

在此所用，“治疗”的意思是使任何状态、不适或疾病的症状得到改善或存在有益变化的方法。治疗也包括其中组合物的任意药物治疗应用。

在此，通过服用特定的药物治疗组合物达到特定不适的症状“改善”是指任何的减轻，不管是永久的还是暂时的，持久的还是短暂，只要该减轻可以归功于或是与服用组合物有关系。

在此所用，“抗体”是以其最宽的含义范围得以使用，具体地说包括完整单克隆抗体、多克隆抗体、从至少两种完整抗体形成的多专一性抗体，例如双特异性抗体和只要表现出期望的生物学活性的抗体片段。举例而言，抗体可以是 IgM、IgG，例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄、IgD、IgA 或 IgE。

在此所用，“抗体片段”包括完整抗体的一部分，通常是完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab, Fab', F(ab')₂, 和 Fv 片段；双体；单链抗体分子；以及由抗体片段形成的多专一性抗体。

在此所用，“单克隆抗体”是指本质上同源性的抗体群的抗体，也就是，组成抗体群的单个抗体是相同的，除非可能发生的数量极少的自然突变。单克隆抗体也是高度专一的，只针对一个抗原位点。更进一步而言，与典型的包括针对不同决定簇（抗原决定部位）的不同抗体的传统抗体（多克隆抗体）的制备物不同，每个单克隆抗体只针对抗原上的单一决定簇。除了其专一性，单克隆抗体还具有一个优点，即它们是通过杂交瘤培养合成的，不会被其他免疫球蛋白污染。

在此所用，“多克隆抗体”是指就像在动物体内的情况一样，由几个 B 淋巴细胞克隆产生的抗体。通常是指出现在免疫动物体内的抗体，而单克隆抗体是通常由体外培养的单克隆 B 淋巴细胞的产物。

在此所用，“杂交瘤”是指杂交细胞，其中肿瘤细胞构成原始细胞之一。典型的杂交瘤是由 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞与产生单克隆抗体的适当的骨髓瘤细胞系的杂交细胞。

在此所用，“人源化抗体”是指经过修饰含有“人的”氨基酸序列的抗体，以便使用于人体时不引发免疫反应。制备这种抗体的方法是已知的。举例而言，用重组 DNA 技术改变表达单克隆抗体的杂交瘤细胞使其表达非可变区的氨基酸序列基于人抗体的抗体。已有计算机程序用于区分那样的区域。

在此所用，“重组方法生产”是指使用重组核酸方法的生产方法。本方法是以众所周知的用克隆化的核酸表达所编码的蛋白质的分子生物学方法。

在此所用，“互补的”当是指两个核酸分子时，意思是两个核苷酸序列能杂交，优选是低于 25%，更优选是低于 15%，甚至更加优选是低于 5%，最优选是在相对的核苷酸处不存在错误配对。优选在严格条件下，这两个分子杂交。

在此所用，决定错误配对百分率的“杂交的严格性”如下规定：

高严格性：0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 65°C；

中等严格性：0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C；（也指适度严格性）

低严格性：1.0 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C；

应理解为使用对等的缓冲液、盐和温度，可以获得相当的严格性。

在此所用，“载体（或质粒）”是指用于将外源 DNA 导入细胞进行表达或复制的不连续的元件。选择和使用此种载体在这种技术人员的技术范围内是广为人知的。表达载体包括能表达 DNA 的载体，其 DNA 有效地与调控序列，例如启动子区域，连接在一起。调控序列能影响该段 DNA 片段的表达。所以，一个表达载体是指重组 DNA 或 RNA 构成物，例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体，它们一旦导入适当的宿主细胞中，导致克隆的 DNA 表达。合适的表达载体对本领域的技术人员而言十分清楚，并且包括能在真核细胞和/或原核细胞中复制

的载体以及保持游离态或整合进宿主细胞基因组的载体。

在此所用，“启动子区域或启动子元件”是指控制与其有效连接的 DNA 或 RNA 的转录 DNA 或 RNA 片段。启动子区域包含足以让 RNA 聚合酶识别、结合和转录起始的特定序列。启动子区域的这一部分是指启动子。并且，启动子区域还包括调节 RNA 聚合酶识别、结合和转录起始活动的序列。这些序列可以是顺式作用因子或对反式作用因子作出响应。依据调节的性质，启动子可以是组成型的或调节型的。考虑用于原核生物的典型的启动子包括噬菌体 T7 和 T3 启动子和相似的启动子。

在此所用，“有效连接和有效结合”是指核苷酸效应序列和调节序列，例如启动子、增强子、转录和翻译终止位点和其他信号序列与 DNA 间的功能关系。举例而言，DNA 和启动子的有效连接是指 DNA 和启动子间的物理和功能关系，该关系使专一识别、结合和转录该段 DNA 的 RNA 聚合酶能够从启动子处起始该段 DNA 的转录。为便于优化表达和/或体外转录，有必要去掉、增加或改变克隆的 5'不翻译部分，以便消除多余的、潜在不适当替代性翻译起始密码子或其他不论是在转录或翻译水平上干扰或减少表达的序列。其他方法还有将核糖体结合位点共有序列紧接起始密码子的 5'插入，可以增强表达。(参考实例，Kozak, 生物化学杂志 (*J. Biol. Chem.*) , 266:19867-19870 (1991)。这一改正的愿望(或需要)可由经验来决定。

在此所用，“蛋白质结合序列”是指具备广泛针对其他蛋白或肽序列，一组蛋白或肽序列或特定蛋白或肽序列的专一结合能力的蛋白或肽。

在此所用，“抗原决定部位标签”是指对应于抗原决定部位的氨基酸残基短序列，其有助于随后对“抗原决定部位标记”的蛋白或肽的生物化学和免疫学分析。“抗原决定部位标签标记”是通过在合适表达载体的蛋白编码序列上附加“抗原决定部位标签”序列实现的。“抗原决定部位标记”的蛋白能使用由标签产生的高度专一性的抗体进行亲和纯化。

在此所用，“蛋白 A 或蛋白 G”是指能与许多 IgG 同形体的 Fc 区域结合的蛋白。蛋白 A 或蛋白 G 典型地存在于葡萄球菌的某些菌株

的细胞壁中。应在蛋白 A 或蛋白 G 中包含确实不影响其活性的保守氨基酸替代序列。

在此所用，“核苷酸结合序列”是指具备广泛针对核苷酸序列，一组核苷酸序列或特定核苷酸序列的专一结合能力的蛋白或肽序列。

在此所用，“脂类结合序列”是指具备广泛针对脂类，一组脂类或特定脂类物质的专一结合能力的蛋白或肽序列。

在此所用，“多糖结合序列”是指具备广泛针对多糖，一组多糖或特定多糖物质的专一结合能力的蛋白或肽序列。

在此所用，“金属结合序列”是指具备广泛针对金属离子，一组金属离子或特定金属离子的专一结合能力的蛋白或肽序列。

B. 使用 ErbB-3 预防、治疗或延缓肿瘤的方法

从一个方面来说，本发明涉及预防、治疗和延缓哺乳动物体肿瘤的方法。该方法包括给动物服用达到预防、治疗或延缓肿瘤所需的或适当的，有效量的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段，从而产生针对所述肿瘤的免疫反应，进而所述肿瘤得以预防、治疗或延缓。

本发明的方法能用于任何哺乳动物肿瘤的预防、治疗或延缓，例如小鼠、家鼠、兔子、猫、狗、猪、奶牛、牛、绵羊、山羊、马、猴子和其它非人的灵长类。优选地，本发明的方法能用于人类肿瘤的预防、治疗或延缓。

任何能引发针对要治疗、预防或延缓的肿瘤出现免疫反应的适当的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段，都能用于本方法中。ErbB-3 引发的免疫反应可能是细胞水平的，体液水平或两者兼而有之。例如，美国专利 No.5,820,859 公开的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段能用于本方法中。在其他的实例中，来源于家鼠 ErbB-3 的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段(GenBank Accession No. U29339; 和 Hellyer 等，基因 (Gene) , 165(2):279-284 (1995))，Fugu rubripes ErbB-3 (GenBank Accession No. AF056116; 和 Gellner 和 Brenner, 基因组研究 (Genome Res.) , 9(3):251-258 (1999))，人 ErbB-3 (GenBank Accession No. M29366; 和

Kraus 等, 美国国家科学院院刊 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*) , 86:9193-9197 (1989))能够用于本方法中。优选地, 来自人的 ErbB-3 的 ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段用于本方法中。存在保守核苷酸序列替换但不严重影响其活性的任何 ErbB-3 蛋白, 或其功能片段能用于本方法中。

在优选实施方案中, 施用有效量的 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域的核酸或其功能片段。在另一优选实施方案中, 施用有效量包括 SEQ ID NO:1 所述的氨基酸序列组成的 ErbB-3 蛋白。仍在另外一优选实施方案中, 施用有效量包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所述的氨基酸序列组成的 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段。

本方法进一步包括给哺乳动物施用免疫反应增强剂。免疫反应增强剂可在施用 ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段之前、同时或随后进行。典型的免疫增强剂包括卡介苗(BCG) (Ratliff, *Eur. Urol.*, 2:17-21 (1992)), 小棒状杆菌 (Lillehoj et al., *Avian Dis.*, 37(3):731-40 (1993)), 布鲁氏菌流产胎提取物(*Brucella abortus extract*), 葡聚糖, 左旋咪唑, 双二乙氨基乙基芴酮, 酶, 无毒病毒, 多糖, 药草提取物例如中草药提取物。

ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段的使用配方、剂量和给药途径, 尤其作为药物组合物时, 可根据本技术领域所知的方法加以确定。(参见, 例如, 雷明顿: 药剂学科学与实践(*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*), Alfonso R. Gennaro (编者), Mack 出版社, 1997 年四月; 治疗用肽和蛋白: 配方、加工和传递系统 (*Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*), Banga, 1999; 和肽和蛋白制药配方的发展 (*Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*), Hovgaard 和 Frkjr (编者), Taylor & Francis 公司, 2000; 脂质体的医学应用 (*Medical Applications of Liposomes*), Lasic 和 Papahadjopoulos (编者), Elsevier Science, 1998; 基因治疗教程 (*Textbook of Gene Therapy*), Jain, Hogrefe & Huber 出版社, 1998; 腺病毒: 基因治疗的基本生物学 (*Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*), 15

卷, Seth, Landes Bioscience, 1999; 生物制药的药物设计和发展 (*Biopharmaceutical Drug Design and Development*) , Wu-Pong 和 Rojanasakul (编者), Humana 出版社, 1999; 治疗学上的血管发生: 从基础科学到临床 (*Therapeutic Angiogenesis: From Basic Science to the Clinic*), 28 卷, Dole 等(编者), Springer-Verlag New York, 1999)。ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段可配制成为口服, 直肠给药, 局部用药, 吸入法用药, 口腔用药(例如舌下), 注射用药(例如, 皮下的, 肌内的, 皮内的, 静脉的), 经皮给药或其他适合的给药途径。在任何给定的情况下, 最合适的给药途径将取决于要治疗情况的性质和严重程度以及所用的特定 ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段的性质。

ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段能用于哺乳动物的任何合适的部位。优选地, ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段用于肿瘤的原位给药, 即使用于肿瘤发生的地方或其邻近部位。并且, 优选地, 本方法进一步包括在肿瘤发生的原位使用免疫反应增强剂。

ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段能够单独使用。替代地和优选的方式是, ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段与药物治疗上可接受的载体或者赋形剂共同使用。任何合适的药物治疗可以接受的载体或者赋形剂能用于本方法中。(参见, 例如, 雷明顿: 药剂学科学与实践 (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*), Alfonso R. Gennaro (编者), Mack 出版社, 1997 年四月)。

本方法能单独使用。或者, 本方法能与其它抗肿瘤方法, 例如放射治疗、化疗和手术治疗, 联合使用。本方法也能与其它抗肿瘤药剂联合使用。其它抗肿瘤治疗或药剂能够用于 ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段的使用之前、之中或之后。举实施例而言, ErbB-3 蛋白, 或其功能片段, 或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸, 或其功能片段能与抗肿瘤药剂共同使用。

任何合适的抗肿瘤药剂能用于本方法中。典型的抗肿瘤药剂包括

抗血管生成剂(参见，例如，Auerbach 和 Auerbach, *Pharmacol. Ther.*, 63(3):265-311 (1994))、烷化剂、抗代谢剂、某种自然产品、铂配位络合物、蒽二酮、取代尿素、甲肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、某种激素、拮抗剂、肿瘤基因抑制剂、肿瘤抑制子基因或蛋白、抗癌基因抗体、抗癌基因反义寡聚核苷酸、抗癌细胞表面抗原抗体和其它抗肿瘤疫苗。

编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段，或任何肿瘤抑制子基因能以裸 DNA、复合体 DNA、cDNA、质粒 DNA、RNA 或其它混合物的形式作为基因转移系统的成分加以使用。在另一实施方案中，编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段，或肿瘤抑制子基因包含于一个病毒载体中。任何适合于基因治疗的病毒载体能在本联合使用中加以使用。例如，腺病毒载体（美国专利 No.5,869,305）、猴病毒载体（美国专利 No.5,962, 274）、条件复制型人免疫缺陷型病毒载体（美国专利 No.5,888, 767）、反转录病毒、猿猴病毒-40、单纯性疱疹病毒扩增子载体和牛痘病毒载体能够使用。并且，这些基因能转入非病毒载体系统，例如脂质体，在脂质体中，脂质在凝聚过程中保护 DNA 或其它生物物质不受氧化。

本方法能用于治疗、预防或延缓任何合适的肿瘤或癌症。优选地，本方法用于治疗、预防或延缓任何合适的其中 ErbB-2 和 ErbB-3 的相互作用是关键的致病因素或加强因素的肿瘤或癌症。例如，本方法能用于治疗、预防或延缓肾上腺、肛门、听觉神经、胆小管、膀胱、骨、脑、乳房、bruccal、中枢神经系统、宫颈、结肠、耳、子宫内膜、食管、眼睛、眼睑、输卵管、胃肠道、头颈部、心脏、肾、喉、肝、肺、下颚、下颚外侧髁、上颌骨、嘴、鼻咽、鼻子、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、阴茎、耳廓、垂体、前列腺、直肠、视网膜、唾液腺、皮肤、小肠、脊髓、胃、睾丸、甲状腺、扁桃腺、尿道、阴道、耳蜗前庭神经和阴唇肿瘤。优选地，本方法能用于治疗、预防或延缓乳房、卵巢、胃、前列腺、结肠和肺部癌症。更优选地，本方法用于治疗、预防或延缓乳癌。

根据本发明，无论单独或是与其它药剂、载体或赋形剂联合使用的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其

功能片段，可以系统用于任何的给药途径，诸如海绵体内注射、皮下注射、静脉注射、肌肉注射、皮内注射、口服或局部用药。本方法可以使用以单位剂量形式、一次用量针剂或多剂量容器的含有添加的防腐剂的注射制剂。该配方可以采用油质或水质赋形剂中的悬浊液，溶液或乳浊液形式并且可以包含配方试剂，例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。活性成分也可以是粉状，以便在使用前与适合的载体、无菌不含热源的水或其他溶剂混合。本发明的局部用药可以采用泡沫状物、凝胶体、霜、药膏、透皮药膏或软膏。

可能用于本发明的药物治疗可接受的组合物和方法包含在，但不仅仅限于美国专利 Nos. 5,736,154; 6,197,801 B1; 5,741,511; 5,886,039; 5,941,868; 6,258,374 B1; 和 5,686,102 中。

治疗或预防中药物治疗剂量的大小将随治疗的状况的严重程度和给药途径变化。剂量和剂量频率也将根据病人自身年龄、体重、疾病状况和反应而变化。

请记住主治医生应当知道怎样和何时由于药物毒性或不利的效应终止、中断或将治疗调整到低剂量。相反地，医生应当知道怎样和何时由于临床效应不足（排除了毒性副效应），将治疗调整到高水平。

任何适合的给药途径可以使用。剂量形式包括片剂、锭剂、扁囊剂、分散体、悬浊液、溶液、胶囊、药膏和类似形态。参考，雷明顿氏药物治疗科学。

在实际应用中，无论单独或是与其它药剂联合使用的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段，可以根据传统药物治疗混合技术作为活性成分与诸如 β -环糊精和 2-羟基-丙基- β -环糊精的药物治疗载体或赋形剂形成紧密添加混合物。载体根据期望使用方式，局部或注射用药，采取多种配制形式。在制备用于注射剂的组合物时，例如静脉注射或静脉灌输，相同的制药介质可以使用，水、乙二醇、油、缓冲液、糖、防腐剂、脂质体和其他具有本技术领域技能的人所知的介质。注射组合物的实例包括，但不限于，5% w/v 的葡萄糖、正常生理盐溶液或其他溶液。无论单独或是与其它药剂联合使用，待给药的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段的总剂量可以在一小瓶含有体积从 1 毫升

到 2000 毫升的静脉内液体中使用。根据所用的总剂量，稀释液体体积将有所变化。

本发明还提供了进行本发明治疗方案的试剂盒。该试剂盒包括置于一个或多个容器中的无论单独或是与其它药剂联合使用的治疗有效量的 ErbB-3 蛋白，或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的核酸，或其功能片段。优选的药物形式是与无菌生理盐水，葡萄糖溶液或缓冲液溶液或是其它制药上可以接受的无菌液体联合使用。组合物也可以冻干或干燥；在这种情况下，试剂盒进一步可随意地包括存于一个容器中的药学上可接受的溶液，优选无菌溶液，以重新组成复合物形成注射溶液。典型的药学上可接受的溶液是生理盐水和葡萄糖溶液。

在另一个实施方案中，本发明的试剂盒进一步包含一枚用于注射组合物的优选无菌包装的注射针或注射器和/或包装的酒精衬垫。适合于医生或病人使用本组合物的指示性说明随意地包含在试剂盒上面。

C.ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段，或者编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域的核酸或其功能片段

从另一个方面来说，本发明涉及分离的核酸片段，该分离的核酸片段在低、中和高严格条件下与编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的核苷酸序列或其互补链杂交，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中所述的氨基酸序列。

在一个优选的实施方案中，分离的核酸片段在高严格条件下与编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的核苷酸序列或其互补链杂交，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中所述的氨基酸序列。在另外一个优选的实施方案中，分离的核酸片段包括编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的核苷酸序列或其互补链，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中所述的氨基酸序列。仍在另外一个优选的实施方案中，分离的核酸片段包括在 SEQ ID NO:4 (图 1) 或 SEQ ID NO:5 (图 6) 中表示的氨基酸序列所对应的核苷酸序列或其互补链。

分离的核酸片段可以是任何适当的形式。例如，分离的核酸片段

能包括 DNA、RNA、PNA 或其衍生物。此外，分离的核酸片段可以包含 DNA 和 RNA 或其衍生物。分离的核酸片段能够是单链形式并且适合于杂交分析。另外，分离的核酸片段也能够是双链形式并能够在杂交分析前变性成单链结构。

分离的核酸片段可以包括包含遗传信息编码和/或自然发生的结构的任何一种寡聚核苷酸或核酸链。分离的核酸片段能够包括非自然结构，例如非自然碱基，例如次黄嘌呤和黄嘌呤，非自然糖类，例如 2'-甲氧基核酸，或非自然磷酸二酯键，例如甲基磷酸酯、偶磷酯和肽。

分离的核酸片段能用任何适合的方法产生。例如，分离的核酸片段能由化学合成(参见，Ausubel (编者) 分子生物学流行方法 (*Current Protocols in Molecular Biology*), 2.11. 寡核苷酸的合成和纯化(*Synthesis and purification of oligonucleotides*)，John Wiley & Sons 公司(2000))，从自然材料中分离，由重组方法产生或者由上述方法的结合产生。优选地，用重组方法产生分离的核酸片段。

分离的核酸片段能够因为不同目的予以标记，例如有助于检测、纯化和/或与表面的附着。标记物可以是化学的，酶的，免疫源性的，放射性的，发荧光的，发光的或荧光共振能量转移标记 (FRET)。

本发明还提供了包括上述核酸片段的质粒。进一步提供了包括上述质粒的细胞。能够使用任何适合的细胞，例如，细菌细胞、酵母细胞、真菌细胞、植物细胞、昆虫细胞、动物细胞和人细胞。

在另一个方面，本发明涉及生产 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的方法，该方法包括在细胞表达 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的条件下培养上述细胞以及回收表达的 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段。

在另一个方面，本发明涉及基本上纯化的蛋白质或肽，其包括 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段，包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所述的氨基酸序列。用任何一种合适的方法能产生 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段。例如，ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段能够由化学合成，从自然材料中分离，用重组方法产生或由上述方法结合生产。优选地，用重组方法生产 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段。

在另一个方面，本发明涉及一种偶联物，该偶联物包括：a)一种包括 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段（包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 中所述的氨基酸序列）的蛋白质或肽；b)与 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段直接或通过接头连接的促进剂，其中促进剂有助于：i) 亲和分离或纯化偶联物；ii) 将偶联物吸附到表面上；或 iii) 检测偶联物。该偶联物能够是一种融合蛋白。当该偶联物是一种融合蛋白时，促进剂还可以是 i) 在细胞内合成后的亚细胞定位序列；ii) 增强免疫原性的序列；或 iii) 其它蛋白类的肿瘤抗原。此外，ErbB-3 蛋白或其功能片段和促进剂能够用其他方法连接。当偶联物是融合蛋白时，编码偶联物的核酸也予以提供。

偶联物能用化学偶联产生，例如通过硫醇连接，但是优选地是作为融合蛋白用重组方法产生。在融合蛋白中，肽或其片段是连接到 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段的氨基端（N-端）或羧基端（C-端）。在化学偶联物中，肽或其片段可以连接在任何地方，以致偶联反应受到影响，并且可能出现众多的肽或其片段连接到一个 ErbB-3 蛋白，或一个其功能片段，或众多它们之上。

偶联反应能够为本领域技术人员所知的任何方法影响。如下所述，偶联反应能够受到化学方法影响，通过共价键、离子键或其他合适的键。例如，能够使用在 WO 01/02600 中公开的偶联反应的试剂和方法。

在一些实施例中，偶联物是融合蛋白，该偶联物能够通过融合蛋白的蛋白或肽片段与亲和吸附成分之间的亲和吸附予以分离或纯化。亲和作用的任何一种能够用于分离或纯化融合蛋白。亲和作用，如同这里描述的，但不仅仅限于此，是蛋白/蛋白、蛋白/核苷酸、蛋白/脂类、蛋白/多糖或者蛋白/金属间的相互作用。

在其他实施例中，偶联物能够吸附到表面上。更优选地，偶联物能够通过偶联物上的促进剂和吸附表面的亲和吸附成分之间的亲和吸附吸附到表面上。亲和作用的任何一种能够用于吸附偶联物，包括蛋白/蛋白、蛋白/核苷酸、蛋白/脂类、蛋白/多糖或者蛋白/金属间的相互作用。

在另一个方面，本发明涉及一种药物组合物，该药物组合物包括一个分离的核酸片段和药学上可以接受的载体或赋形剂，该分离的核

酸片段在低、中和高严格条件下与编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段的核苷酸序列或其互补链杂交，该 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 表示的氨基酸序列。优选地，该分离的核酸包括编码 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段，包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 表示的氨基酸序列的核苷酸序列或其互补链。药物组合物可以进一步包括免疫反应增强剂和/或抗肿瘤药剂。单独包括上述分离的核酸片段或与免疫反应增强剂混合的疫苗也予以提供。

在另一个方面，本发明涉及一种药物组合物，该药物组合物包括基本上纯化的蛋白质或肽和一种药学上可接受的载体或赋形剂，该蛋白质或肽包括 ErbB-3 蛋白的胞外结构域，或其功能片段，包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 表示的氨基酸序列。药物组合物可以进一步包括免疫反应增强剂和/或抗肿瘤药剂。单独包括上述基本上纯化的蛋白质或肽或与免疫反应增强剂混合的疫苗也予以提供。

在另一个方面，本发明涉及一种抗体，该抗体与 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段，包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 表示的氨基酸序列的一个抗原决定部位结合。优选地，该抗体专一性地与 ErbB-3 蛋白的胞外结构域或其功能片段，包括 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 表示的氨基酸序列的一个抗原决定部位结合。

抗体能够是任何适合的形式。例如，抗体能够是单克隆的、多克隆的、嵌合的、单链的、人的或人源化的抗体(例如，参见，美国专利 No. 5,968,511)。不同形式的抗体能够依据本领域所知的任何方法制备(例如，参见，Coligan 等(编者)，*免疫学流行方法* (Current Protocols in Immunology), John Wiley & Sons 公司(2000))。单独包括上述抗体或与抗肿瘤药剂混合药物组合物和一种药学上可接受的载体或赋形剂也予以提供。

实施例

下面是仅用于说明目的的典型的实施例。

本发明者发现 B3、DE3-1 作为肿瘤疫苗在治疗人类乳腺癌等癌症的作用及方法。

本发明者发现 B3 作为肿瘤疫苗在对人类乳腺癌等肿瘤的发生率具有显著的降低作用。

本发明者提供了用 B3 作为肿瘤疫苗在预防人类乳腺癌等高危人群的肿瘤具有显著降低发生率作用的方法。

本发明者发现 B3、DE3-1 作为肿瘤疫苗对人类乳腺癌等肿瘤的发生时间也有显著的延迟作用。

本发明者发现 B3、DE3-1 作为肿瘤疫苗在对人类乳腺癌等肿瘤的生长具有显著的抑制作用。

本发明者提供了一种抑制乳腺癌等癌细胞生长的方法。这种方法是通过机体的免疫反应的应答形成来实现的。

上述的细胞可以是一个肿瘤细胞，更可以是人的乳腺癌细胞及其他 ErbB-2/ErbB-3 高表达的癌细胞。

根据本发明来实现上述方法，是用一种应用基因工程表达的 ErbB-3 蛋白抗原：DE3-1 为大肠杆菌表达蛋白；B3 为真核细胞表达蛋白的抗原或以其他方法产生的 ErbB-3 抗原，ErbB-3 抗原可以是 ErbB-3 分子或部分片段。

在一种典型的情况下，用一定剂量的以各种方式产生的 ErbB-3 疫苗用于乳腺癌等癌症的治疗可以抑制肿瘤的生长。

上述所描述的癌症包括乳腺癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、直肠癌和肺癌等。

为了更清楚地理解前述发明，以下详细说明。

一. 实验材料及方法

(一) B3 及 DE3-1 疫苗的制备

本研究中，所涉及的疫苗包括以 ErbB-2 细胞膜外蛋白及膜外蛋白部分片段，在这里分别称为 B2、SD32。ErbB-3 细胞膜外区蛋白分子及膜外蛋白的部分片段为实验样品，在这里分别称为 B3、DE3-1；以上四种疫苗均由上海泽生科技开发有限公司制备。B3 及 DE3-1 的制备方法如下：

1. B3 制备：

B3 基因是编码的 ErbB-3 细胞膜外区蛋白的 cDNA 序列，见图 1；以 PCR 方法扩增，引物序列为

引物 1, 5'TCTGCGGAGTCATGAGGGC (SEQ ID NO:6)

引物 2, 3'TCACITGTGTCGTCATCGTCCCTGTAGTCTTGCCGATCAGCACCAAGTGT
(SEQ ID NO:7)

其中斜体部分为 flag 序列。

目的基因经 PCR 扩增后，克隆至 pMD-18T 载体中，转化子经酶切及测序鉴定正确后（见图 2），用 BamHI/SalI 切出，连接至 pCDNA3BamHI/xhoI 中。

高效表达工程菌的建立和筛选：取经 PCR 和酶切鉴定的工程菌克隆，进行 15%SDS-PAGE 电泳、薄层扫描分析、Western-blotting 鉴定，经反复筛选获得一株稳定高表达目的蛋白工程菌。B3 蛋白纯化，亲和层析纯化，见图 4。B3 纯化蛋白经氨基酸序列测定与目的蛋白，氨基酸序列见图 5。

2. DE3-1 制备

PCR 扩增目的基因为编码 ErbB-3 膜外蛋白的片段 cDNA 序列（cDNA 序列自 Genebank），序列见图 6；表达质粒的构建：将目的基因片段从 pGEX4T-1 载体（Pharmacia 公司）中用 BamHI/XhoI 切出，连接入 pET32a 载体（Novagen 公司）BamHI/XhoI 中，此蛋白以 T7 启动子驱动表达，N 端与 Trx.Tag, HisTag 及 S-Tag 融合，图谱见图 7。质粒构建酶切验证见图 8。

DE3-1 蛋白表达：将质粒转入 BL21 菌株，接种菌株到 5ml LB+AP 中，过夜；1: 100 接种到温热的 LB+AP 中，37℃，2.5-3 hrs (OD=0.6)；经 IPTG 诱导 37℃，3hrs 或 30℃、8hrs；4℃离心，6K、10min；去上清，将沉淀置冰上；用冷的、1/20 菌液体积的 PBS 悬浮，后用超声破碎；4℃离心，12K，10min 可得大量 34KD 的目的蛋白（见图 9）。DE3-1 蛋白纯化：DE3-1 蛋白出现在包涵体中，经 6M 盐酸胍溶解后，透析到 NTA-O 缓冲液（Histag 纯化溶液），复性情况良好。用 Histag 亲和层析柱纯化（购自博采公司）图 10，纯化 DE3-1 蛋白经氨基酸序列测定，与目的蛋白序列一致，氨基酸序列图 11。

（二）B3 及 DE3-1 抗瘤效应研究

1. B3 及 DE3-1 对肿瘤发生的预防作用

选用 8-10 周龄的 FVB/N 转 neu 基因小鼠（购自 Jackson Lab.USA），

动物分为五组，每组 40 只，分别为对照组、B2、SD32、B3 及 DE3-1 组，分别用 BSA、B2、SD32、B3 及 DE3-1 与完全弗氏佐剂（CFA, complete Freud's adjuvant, 购自 Sigma 公司）混合后，每 20 天腹腔注射一次，共 7 次。BSA、B2、SD32、B3 及 DE3-1 疫苗剂量分别为 10、5、10、5、10 μ g/只/次。每周检查一次发病情况。确定肿瘤发生情况，并进行统计分析。

2. B3 对肿瘤免疫治疗作用

移植性肿瘤模型，选用经免疫组化检测 neu 蛋白高表达的 FVB/N 转基因小鼠自发性肿瘤，取大约 1000mm³ 左右肿瘤块，用尼龙网将肿瘤块磨成单个细胞，每只 FVB/N 转基因小鼠注射细胞量为 5×10^6 个，乳腺下注射接种。接种后 10-14 天左右，对照组可触及 (>5mm) 肿瘤出现，造模即成功。

实验分组为对照组，不作任何处理；SD32 实验组、B3 实验组在接种 24 小时后，开始用 SD32 和 B3 疫苗进行治疗，分别将上述疫苗吸附在 0.1mg/ml 的 Al(OH)₃ 上，小鼠皮下多点注射；每两周一次，共三次；第三次用药 14 天后结束实验。每周检查一次发病情况，用游标卡尺测量每周测量肿瘤大小，以肿瘤体积（长径 \times 短径²/2）来代表其大小，并绘肿瘤生长曲线。

实验结束后取出肿瘤称重并计算抑制率，抑制率=[(对照组肿瘤重量-实验组肿瘤重量)/对照组肿瘤重量]x100

3. 不同剂量 DE3-1 对肿瘤免疫治疗作用研究

动物及移植性肿瘤模型制作方法：同上（B3 及 DE3-1 疫苗对肿瘤免疫治疗作用研究）。动物分组分别为空白对照组为移植性肿瘤模型未加任何处理、阴性对照组为注射 histag 蛋白；阳性对照组以阿霉素（汕头明治医药有限公司）治疗，DE3-1 实验组分为 5 μ g, 20 μ g, 80 μ g 剂量处理。

接种 1 天后，阳性对照组小鼠，腹腔注射阿霉素，2.2mg/Kg，连续用药 7 天；阴性对照组小鼠腹腔注射 histag 蛋白+Al(OH)₃；DE3-1 实验组，DE3-1 疫苗吸附在 0.1mg/ml 的 Al(OH)₃ 上，小鼠皮下多点注射免疫进行免疫治疗，每两周用药一次，共三次。第三次用药 14 天后实验结束。每周检查一次发病情况，用游标卡尺测量测量肿瘤大小，以肿

瘤体积（长径 \times 短径 $^2/2$ ）来代表其大小，并绘肿瘤生长曲线，进行统计分析。

实验结束后取出肿瘤称重并计算抑制率，抑制率=[(对照组肿瘤重量-实验组肿瘤重量)/对照组肿瘤重量] $\times 100$ ，进行统计分析。

4. B2 和 B3 交叉免疫原性实验

用 B2 蛋白和 B3 蛋白分别免疫 FVB 转基因小鼠，免疫十天后，取血，用 ELISA 方法测其抗体滴度。用 0.3ug/孔的 B2 和 B3 分别包被，在每个板上分别测定 1:1000 稀释的 B2 和 B3 以及 B2 和 B3 标准血清，在 37℃ 孵育 30 分钟，后用 1%BSA 封闭，加用二抗，用 DAD 显色 15 分钟，Bio-Rad 酶标仪，450nm 检测。

二. 实验结果及讨论

1.B3 及 DE3-1 抑瘤效应研究实验结果见表 1、图 12

表 1. B3 及 DE3-1 疫苗抑瘤效应研究实验结果

分组	数量(只)	处理	剂量($\mu\text{g}/\text{只}/\text{次}$)	肿瘤发生时间(周)	肿瘤发生率(%)
阴性对照组	40	BSA+CFA	10	19	37.5
B2 实验组	40	B2+CFA	5	21	12.5
SD32 实验组	40	SD32+CFA	10	22	10
B3 实验组	40	B3+CFA	5	20	12.5
DE3-1 实验组	40	DE3-1+CFA	10	23	35

本实验目的是了解 B3 及 DE3-1 疫苗是否对肿瘤的发生具有预防作用。选用 FVB/N 转基因小鼠是该转基因小鼠在小鼠乳腺病毒启动子控制的大鼠野生型 neu cDNA 转入小鼠体内，使 neu 蛋白高表达，约在 5-8 个月内自发生成乳腺癌，发生率约为 50%。该转基因小鼠发病过程及病理类型与人类乳腺癌发病过程相似。因此，应用于临床时，可能会更有效。样本为每组 40 只，选用如此大的样本量，目的是确保每组发率个数>10 只，使其具有统计学意义。剂量的选择是根据预实验结果而定的。

用 BSA、B2、B3、SD32、DE3-1 分别免疫转基因小鼠，从图表上看，阴性对照组，从 19 周开始有肿瘤发生肿瘤发生率为 37.5%；而用 SD32, B3, B2 组肿瘤发生开始发生的时间分别为第 21、22 及 20 周，肿瘤的发生率分别为 10%，12.5%，12.5%，说明 SD32, B3, B2 疫苗对

肿瘤的发生具有显著的抑制作用 ($P<0.025$; χ^2 检验), 同时, 它们使肿瘤的发生时间也有延迟。DE3-1 组比对照组肿瘤发生时间晚, 但肿瘤发生率为 35% 和对照组相比没有显著差异 ($P>0.05$; χ^2 检验)。

2.B3 及 DE3-1 疫苗抗肿瘤效应研究实验结果

B3 疫苗抗肿瘤效应研究实验结果见表二及图 13-14

表 2. B3 及 DE3-1 疫苗抗肿瘤效应研究实验结果

分组	处理	肿瘤体积(mm^3)	肿瘤重量 (g)	抑制率(%)
阴性对照组	histag 蛋白+Al(OH) ₃	7849.8±849.8	5.76±0.55	
SD32 实验组	SD32+Al(OH) ₃	4246.5±540.6	3.28±0.36	46
B3 实验组	B3+Al(OH) ₃	5271.8±658.9	3.13±0.33	33

发明人为确定 B3 疫苗在肿瘤治疗的作用, 用 B3 疫苗用于移植性肿瘤模型进行免疫治疗研究。

表 2 及图 13-14 为不同疫苗对小鼠肿瘤生长的影响, 显示 SD32、B3 对肿瘤生长的抑制率分别为: 46%、33%, 显示它们均对肿瘤的生长有显著抑制作用 ($P<0.01$; t 检验)。

3.DE3-1 疫苗抗肿瘤效应研究实验结果

为了进一步确定不同剂量的 DE3-1 对肿瘤生长的免疫治疗作用并在临幊上应用寻找合适的治疗剂量, 实验组以 5 μg , 20 μg , 80 μg /只/次免疫小鼠, 实验结果见表 3 及图 15-16。

表 3. DE3-1 疫苗抗肿瘤效应实验结果

分组	数量	处理	肿瘤体积(mm^3)	肿瘤重量 (g)	抑制率%
空白对照组	8		6742.9±657.8	4.769±0.56	
阴性对照组	8	histag 蛋白+Al(OH) ₃	6476.9±567.9	4.461±0.52	
阳性对照组	8	ADR 2.2mg/kg	4603.1±478.3	3.564±0.42	25.3
DE3-1 实验组	8	80 μg DE3-1+Al(OH) ₃	4810.8±460.5	3.658±0.37	26.3
DE3-1 实验组	8	20 μg DE3-1+Al(OH) ₃	4715.0±434.8	3.455±0.41	28.9
DE3-1 实验组	8	5 μg DE3-1+Al(OH) ₃	5563.7±600.6	3.687±0.45	22.4

从 DE3-1 不同剂量对肿瘤的生长抑制率与所测体积结果基本是一致的, DE3-1 20 μg 剂量组抑制效果最好, 达 28.9% 左右。实验结束处死小鼠后, 取出肿瘤, 称量重量, 统计分析阳性对照组, 各剂量组与阴性对照和空白对照有显著差别 ($P<0.001$, t test)。它们在第 6 周实

验结束时 5 μg, 20 μg, 80 μg 剂量组对肿瘤的抑制率分别为 26.3%, 22.4% 和 28.9%。

4.B2 和 B3 交叉免疫原性实验

B2 和 B3 交叉免疫原性实验是为了解同属于一家族的 B2 和 B3 蛋白两者之间是否具有交叉免疫原性。结果见图 17-18, 由结果可知 B2 和 B3 二者之间没有交叉免疫原性。

三. 小结

在此研究中, 我们发现了基于一个新的抗癌靶标 ErbB-3 而设计的具有预防肿瘤发生作用以及对肿瘤具有免疫治疗作用、并具有广泛应用前景的新型疫苗 B3 及 DE3-1。

在以往的研究中, 在部分腺癌中, 存在着高表达的 ErbB-2 受体, 过去一直认为它们形成同源二聚体并和癌症的发生有密切的联系。认为 ErbB-2 高表达是部分腺癌发生的主要原因, 原因在于 1) ErbB-2 在乳腺癌、卵巢癌等肿瘤细胞中存在 ErbB-2 基因的扩增而导致 ErbB-2 的高表达, 2) ErbB-2 的高表达导致了它的细胞内功能区的磷酸化影响了细胞内信号分子 Shc 与 ErbB-2 的相互作用; 3) 用野生型 ErbB-2 转染成纤维细胞, 导致细胞转化; 4) 能增强 ErbB-2 同源二聚体形成的 ErbB-2 变异体也能增强它的细胞转化活力。

而本发明人在此之前发现 ErbB-3 为 ErbB-2 之外的另一个新的抗癌靶标, 发明人阐明 ErbB-2 受体的高表达导致 ErbB-2 受体和 ErbB-3 受体形成的异源二聚体才是癌症发生的原因。这个靶标的发现使我们又有了新的抗癌方法: 以 ErbB-3 细胞膜外区蛋白为抗癌疫苗用于癌症的预防及治疗, 使得乳腺癌的发生率降低及抑制肿瘤生长作用。

正是基于对 ErbB-2 高表达导致 ErbB-2 与多种肿瘤发生有关的研究, 而针对 ErbB-2 为靶标人源化单克隆抗体-herceptin 的巨大成功, 然而由于 ErbB-2 和 ErbB-4 受体在心肌细胞的共表达, 导致 ErbB-2 受体和 ErbB-4 受体异源二聚体的形成, 该异源二聚体对维持心肌细胞的正常结构及功能非常重要, 因此针对 ErbB-2 受体的抗癌药可能会破坏心肌细胞而导致心力衰竭, 而针对 ErbB-3 受体的抗癌药则无此副作用。因而, ErbB-3 作为特异性肿瘤疫苗在乳腺癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、直肠癌和肺癌等预防及治疗中的应用方法具有极其重要的意义。

上述实施例仅用于说明性的目的，不是为了限定本发明的范围。
对上面所述的多种变化是可能的。因为对上述的实施例的修改和变化
对本领域的技术人员而言是显而易见的，所以本发明仅受到所附的权
利要求书的范围限制。

序列表

<110> 上海泽生科技开发有限公司

<120>以ERBB-3为基础的用于肿瘤治疗的方法和组合物

<130> 52401-20003.00

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1342

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1
Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15
Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30
Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
35 40 45
Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
50 55 60
Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
65 70 75 80
Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr
85 90 95
Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp
100 105 110
Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
115 120 125
His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
130 135 140
Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr
145 150 155 160
Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
165 170 175
Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly
180 185 190
Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr
195 200 205
Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn
210 215 220
Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp
225 230 235 240
Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val
245 250 255
Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
260 265 270
Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala
275 280 285
Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala
290 295 300
Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
305 310 315 320
Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser
325 330 335
Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val
340 345 350
Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu
355 360 365
Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu
370 375 380
Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln
385 390 395 400
Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr
405 410 415
Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Phe Ser Leu Leu Ile

420	425	430
Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser		Leu Lys Glu
435	440	445
Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln		Leu Cys Tyr
450	455	460
His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro		Thr Glu Glu
465	470	475
Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys		Val Ala Glu
485	490	495
Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys		Trp Gly Pro
500	505	510
Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg		Gly Gly Val
515	520	525
Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Glu Pro Arg		Glu Phe Ala
530	535	540
His Glu Ala Glu Cys Phe Ser Cys His Pro Glu Cys Gln		Pro Met Glu
545	550	555
Gly Thr Ala Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Asp Thr Cys		Ala Gln Cys
565	570	575
Ala His Phe Arg Asp Gly Pro His Cys Val Ser Ser Cys		Pro His Gly
580	585	590
Val Leu Gly Ala Lys Gly Pro Ile Tyr Lys Tyr Pro Asp		Val Gln Asn
595	600	605
Glu Cys Arg Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys		Lys Gly Pro
610	615	620
Glu Leu Gln Asp Cys Leu Gly Gln Thr Leu Val Leu Ile		Gly Lys Thr
625	630	635
His Leu Thr Met Ala Leu Thr Val Ile Ala Gly Leu Val		Val Ile Phe
645	650	655
Met Met Leu Gly Gly Thr Phe Leu Tyr Trp Arg Gly Arg		Ile Gln
660	665	670
Asn Lys Arg Ala Met Arg Arg Tyr Leu Glu Arg Gly Glu		Ser Ile Glu
675	680	685
Pro Leu Asp Pro Ser Glu Lys Ala Asn Lys Val Leu Ala		Arg Ile Phe
690	695	700
Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Leu Lys Val Leu Gly Ser		Gly Val Phe
705	710	715
Gly Thr Val His Lys Gly Val Trp Ile Pro Glu Gly Glu		Ser Ile Lys
725	730	735
Ile Pro Val Cys Ile Lys Val Ile Glu Asp Lys Ser Gly		Arg Gln Ser
740	745	750
Phe Gln Ala Val Thr Asp His Met Leu Ala Ile Gly Ser		Leu Asp His
755	760	765
Ala His Ile Val Arg Leu Leu Gly Leu Cys Pro Gly Ser		Ser Leu Gln
770	775	780
Leu Val Thr Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp		His Val Arg
785	790	795
Gln His Arg Gly Ala Leu Gly Pro Gln Leu Leu Leu Asn		Trp Gly Val
805	810	815
Gln Ile Ala Lys Gly Met Tyr Tyr Leu Glu Glu His Gly		Met Val His
820	825	830
Arg Asn Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Lys Ser Pro		Gln Val
835	840	845
Gln Val Ala Asp Phe Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro		Pro Asp Asp Lys
850	855	860
Gln Leu Leu Tyr Ser Glu Ala Lys Thr Pro Ile Lys Trp		Met Ala Leu
865	870	875
Glu Ser Ile His Phe Gly Lys Tyr Thr His Gln Ser Asp		Val Trp Ser
885	890	895
Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala		Glu Pro Tyr
900	905	910
Ala Gly Leu Arg Leu Ala Glu Val Pro Asp Leu Leu Glu		Lys Gly Glu
915	920	925
Arg Leu Ala Gln Pro Gln Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr		Met Val Met
930	935	940
Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Glu Asn Ile Arg Pro Thr		Phe Lys Glu
945	950	955
Leu Ala Asn Glu Phe Thr Arg Met Ala Arg Asp Pro Pro		Arg Tyr Leu
965	970	975
Val Ile Lys Arg Glu Ser Gly Pro Gly Ile Ala Pro Gly		Pro Glu Pro
980	985	990

His Gly Leu Thr Asn Lys Lys Leu Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro Glu
 995 1000 1005
 Leu Asp Leu Asp Leu Asp Leu Glu Ala Glu Glu Asp Asn Leu Ala Thr
 1010 1015 1020
 Thr Thr Leu Gly Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Gly Thr Leu Asn Arg
 1025 1030 1035 1040
 Pro Arg Gly Ser Gln Ser Leu Leu Ser Pro Ser Ser Gly Tyr Met Pro
 1045 1050 1055
 Met Asn Gln Gly Asn Leu Gly Glu Ser Cys Gln Glu Ser Ala Val Ser
 1060 1065 1070
 Gly Ser Ser Glu Arg Cys Pro Arg Pro Val Ser Leu His Pro Met Pro
 1075 1080 1085
 Arg Gly Cys Leu Ala Ser Glu Ser Ser Glu Gly His Val Thr Gly Ser
 1090 1095 1100
 Glu Ala Glu Leu Gln Glu Lys Val Ser Met Cys Arg Ser Arg Ser Arg
 1105 1110 1115 1120
 Ser Arg Ser Pro Arg Pro Arg Gly Asp Ser Ala Tyr His Ser Gln Arg
 1125 1130 1135
 His Ser Leu Leu Thr Pro Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Gly Leu Glu
 1140 1145 1150
 Glu Glu Asp Val Asn Gly Tyr Val Met Pro Asp Thr His Leu Lys Gly
 1155 1160 1165
 Thr Pro Ser Ser Arg Glu Gly Thr Leu Ser Ser Val Gly Leu Ser Ser
 1170 1175 1180
 Val Leu Gly Thr Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Tyr Met
 1185 1190 1195 1200
 Asn Arg Arg Arg His Ser Pro Pro His Pro Pro Arg Pro Ser Ser
 1205 1210 1215
 Leu Glu Glu Leu Gly Tyr Glu Tyr Met Asp Val Gly Ser Asp Leu Ser
 1220 1225 1230
 Ala Ser Leu Gly Ser Thr Gln Ser Cys Pro Leu His Pro Val Pro Ile
 1235 1240 1245
 Met Pro Thr Ala Gly Thr Thr Pro Asp Glu Asp Tyr Glu Tyr Met Asn
 1250 1255 1260
 Arg Gln Arg Asp Gly Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Ala Met Gly
 1265 1270 1275 1280
 Ala Cys Pro Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg Ala Phe Gln
 1285 1290 1295
 Gly Pro Gly His Gln Ala Pro His Val His Tyr Ala Arg Leu Lys Thr
 1300 1305 1310
 Leu Arg Ser Leu Glu Ala Thr Asp Ser Ala Phe Asp Asn Pro Asp Tyr
 1315 1320 1325
 Trp His Ser Arg Leu Phe Pro Lys Ala Asn Ala Gln Arg Thr
 1330 1335 1340

<210> 2
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2
 Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
 20 25 30
 Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
 35 40 45
 Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
 50 55 60
 Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr
 85 90 95
 Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp
 100 105 110
 Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
 115 120 125
 His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
 130 135 140
 Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr
 145 150 155 160

Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
 165 170 175
 Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly
 180 185 190
 Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr
 195 200 205
 Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn
 210 215 220
 Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp
 225 230 235 240
 Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val
 245 250 255
 Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
 260 265 270
 Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala
 275 280 285
 Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala
 290 295 300
 Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
 305 310 315 320
 Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser
 325 330 335
 Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val
 340 345 350
 Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu
 355 360 365
 Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu
 370 375 380
 Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln
 385 390 395 400
 Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr
 405 410 415
 Thr Ile Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile
 420 425 430
 Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu
 435 440 445
 Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr
 450 455 460
 His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu
 465 470 475 480
 Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Val Ala Glu
 485 490 495
 Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro
 500 505 510
 Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg Gly Gly Val
 515 520 525
 Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Glu Pro Arg Glu Phe Ala
 530 535 540
 His Glu Ala Glu Cys Phe Ser Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Met Glu
 545 550 555 560
 Gly Thr Ala Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Asp Thr Cys Ala Gln Cys
 565 570 575
 Ala His Phe Arg Asp Gly Pro His Cys Val Ser Ser Cys Pro His Gly
 580 585 590
 Val Leu Gly Ala Lys Gly Pro Ile Tyr Lys Tyr Pro Asp Val Gln Asn
 595 600 605
 Glu Cys Arg Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro
 610 615 620
 Glu Leu Gln Asp Cys Leu Gly Gln Thr Leu Val Leu Ile Gly Lys Thr
 625 630 635 640

<210> 3
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3
 Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
 20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
 35 40 45
 Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
 50 55 60
 Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr
 85 90 95
 Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp
 100 105 110
 Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
 115 120 125
 His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
 130 135 140
 Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr
 145 150 155 160
 Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
 165 170 175
 Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys
 180 185 190

<210> 4

<211> 1914

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

aggggcgaacg acgctctgc	gttgctgggc ttgttttca	gcctggcccg gggctccgag	60
gtgggcaact ctcaggcagt	gtgtcctggg actctgaatg	gcctgaatgt gaccggcgat	120
gctcgagaacc aataccagac	actgtacaag ctctacgaga	ggtgtgagggt ggtgtatgggg	180
aaccttggaa ttgtgctcac	ggggacaaat gcccacccct	ccttcctgcgatggatcg	240
gaagtgcacag gctatgtct	cgtggccatg aatgaattct	ctacttacc attgcccac	300
ctccgcgtgg tggaggggac	ccagggtctac gatgggaatgt	cgccatcttgcgtatgt	360
aactataaca ccaactccag	ccacgcgtcc cgccgcgtcc	gctgcactca gtcaccggag	420
attctgttag ggggtgtta	tattgagaaag aacgataaag	tttgcacat ggacacaatt	480
gactggaggg acatcgtag	ggaccggatg gctgagatag	tggtgaagga caatggcaga	540
agctgtcccc cctgtcatga	ggtttgcgac ggggtctgg	atcagaagac 600	
tgccagacat tgaccaagac	cattctgtgc cctcgtgt	atggtcaactt ctttggccc	660
aaccccaacc agtgctgcca	tgatgatgt gccgggggct	gctcaggccc tcaggacaca	720
gactgttttgcctggc	tttcaatgac agtggggct	gtgtaccccg ctgtccacag	780
cctctgtgtc acaaacaatcg	aactttcccg ctggggacca	atccccacac caagtatcg	840
tatggaggag ttgtgttagc	cagctgtccc cataacttgc	tggtggatca aacatccctgt	900
gtcaggggctt gtctctctga	caagatggaa gtagataaaa	atgggctcaa gatgtgtgag	960
ccttgcgtgg gactatgtcc	caaaggctgt gagggaacag	gtctggggc cggcttccag	1020
actgtggact cgagcaacat	tgtatggact gtgaaactgca	ccaaatgtt gggcaacctg	1080
gactttctga tcacccggct	caatggagac ccctggcaca	atgatccctgc cttggaccca	1140
gagaagctca atgtttccg	gacagtacgg gagatcacag	catccagtc 1200	
ttggccccc acatgcacaa	tttcactgtt ttttccat	tgacacat tggaggcaga	1260
agcccttata accggggctt	ctcattgttg atcatgaaga	acttgaatgt cacatctctg	1320
ggcttccgtt ccctgaagga	atttgcattt gggcgatattt	atataagtgc caataaggcag	1380
ctctgttacc accactcttt	gaactggacc aagggtctc	gggggcctac ggaagagcga	1440
ctagacatca agcataatcg	ggcgccgaga gactgcgtgg	cagaggccaa agtgtgtgac	1500
ccactgtgtc cctctggggg	atgctggggc ccaggccctg	gtcgtgtt gtcctgtcg	1560
aattatagcc gaggagggtgt	ctgtgtgacc cactgcaact	ttctgaatgg ggaggcctcg	1620
gaatttgcctt atgaggccga	tgccaccccg aatgccaacc	catggagggc	1680
actgcacatc gcaatggctc	ggggctctgtat	aatgtgtccca ttttcgagat	1740
ggggcccccact gtgtgagcag	ctggcccccatt	ggaggccctrag gtgccaagggg cccaatctac	1800
aagtacccag atgttcagaa	tgaatgtcg	ccctgcattt agaactgcac ccaggggtgt	1860
aaaggaccag agttcaaga	ctgttttagga	caaacttggc tgctgatcg caaa	1914

<210> 5

<211> 475

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

gatccctgtcc tgggactctg	aatggccctga gtgtgaccgg	cgatgcgttag aaccaataacc	60
agacactgtta caagctctac	gagagggtgt aggtgggtat	ggggacaccc gagattgtgc	120
tcacgggaca caatggccgac	ctctccttcc tcgactgtat	tcgagaatgt acaggctatg	180
tcctcgtggc catgaatgaa	ttctctactc taccattgc	caacccctgc gttgtgcgag	240
ggaccggcagg	ctacgtatggg	aaagtggccatgtt gttgtactat aacaccaact	300

ccagccacgc tctgcgcccag ctccgcttga ctcagctcac cgagattctg tcagggggtg 360
 tttatattga gaagaacgat aagctttgtc acatggacac aattgactgg agggacatcg 420
 tgaggggacg agatgctgag atagtggtga aggacaatgg cagaagctga ctcga 475

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 6
 tctgcggagt catgagggc 19

<210> 7
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 7
 tgtgaccacg actagccgtt tctgatgttc ctgctactgc tgttca 48

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 8
 tcttagagatt ttctgcggag tcatg 25

<210> 9
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 9
 gacgacgacg acaaag 15

<210> 10
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 10
 gccatggctg atatcg 16

<210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 11
 gcaccaccac caccaccact gag 23

说 明 书 附 图

图 1. B3 cDNA 序列 (SEQ ID NO: 4)

图 2 B3 质粒构建的酶切鉴定图

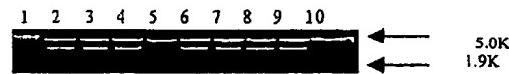


图 3 B3 表达质粒构建技术路线

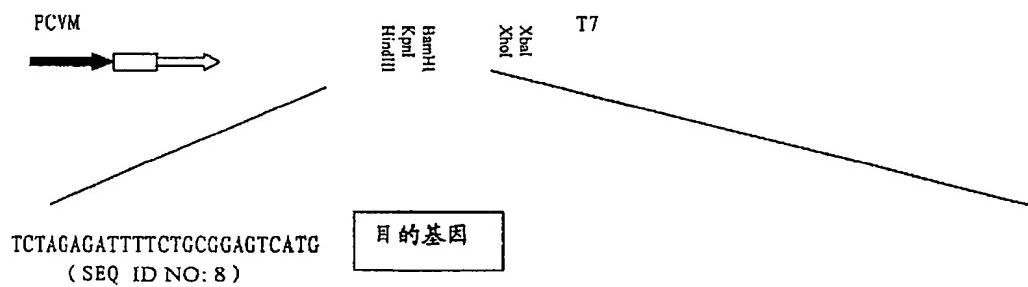


图 4 B3 蛋白纯化

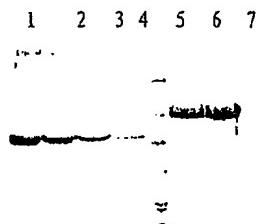


图 5 B3 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)

```

1 MRANDALQVL CLLFSLARGS EVGNSQAVCP CTLNGLSVTG DAENQYQTLK KLYERCEVVM
61 GNLEIVLTGH NADLSFLQWI REVTCYVLVA MNEFSTLPLP NLRVVRCGTQV YDGKFAIFVM
121 LNYNTNSSHA LRQLRLTQLT EILSOCGVYIE KNDKLCHMDT IDWRDIVRDR DAEIVVKDNG
181 RSCPPCBEVC KRCWCGPCSE DCQTLTKTC APQCNGHCFG PNPNQCCHDE CAGGCSCPQD
241 TDCFACRHFN DSGACVPRCP QPLVYNKLTF QLEPNPHTKY QYGGVCVASC PHNFYVDQTS
301 CYRACPPDKM EVDKNGLKMC EPCCGLCPKA CECTGSGSRF QTVDSSNIDG FVNCTKILGN
361 LDPLITGLNG DPWHKIPALD PBXLNVFRTV REITGYLNQ SWPPHMHNFS VFSNLTTIGG
421 RSLYNRGFSL LIMKNLNVTS LGFRSLKEIS AGRIYISANR QLCYHSLNW TKVLRGPTEE
481 RLDIKHNRPR RDCVAEGKVC DPLCSSGGCW GPGPGQCLSC RNYSRGGVCV THCNFLNGEP
541 REPAHEAECAF SCHPECQPME GTATCNGSGS DTCAQCAHFR DGPHCVSSCP HGVLGAKGPI
601 YKYPDVQNEC RPCHENCTQG CKGPELQDCL GQTLVLIGHT

```

图 6. DE3-1cDNA 序列 (SEQ ID NO: 5)

```

gatcctgtcctg ggactctgaa tggcctgagt gtgaccggcg atgcgtgagaa ccaataccag
acactgtaca agctctacga gagggtgttagt gtttgtatgg ggaaccttga gattgtgttc
acgggacaca atggcgacct ctcccttcctg cagtggatc gagaagtgtac aggctatgtc
ctcggtggcca tgaatgaatt ctctactcta ccattggccca acctccgcgt ggtgcggaggg
acccagggtct acgatggaa gtttgcacat ttcgtcatgt tgaactataa caccaactcc
agccacgctc tgcccaagct ccgtttgact cagctcaccc agattctgtc aggggggttt
tatattgaga agaacgataa gctttgtcac atggacacaa ttgactggag ggacatcgat
agggaccgag atgcgtgagat agtggtgaag gacaatggca gaagcTGA ctcgta

```

图 7. DE3-1 构建质粒序列图谱

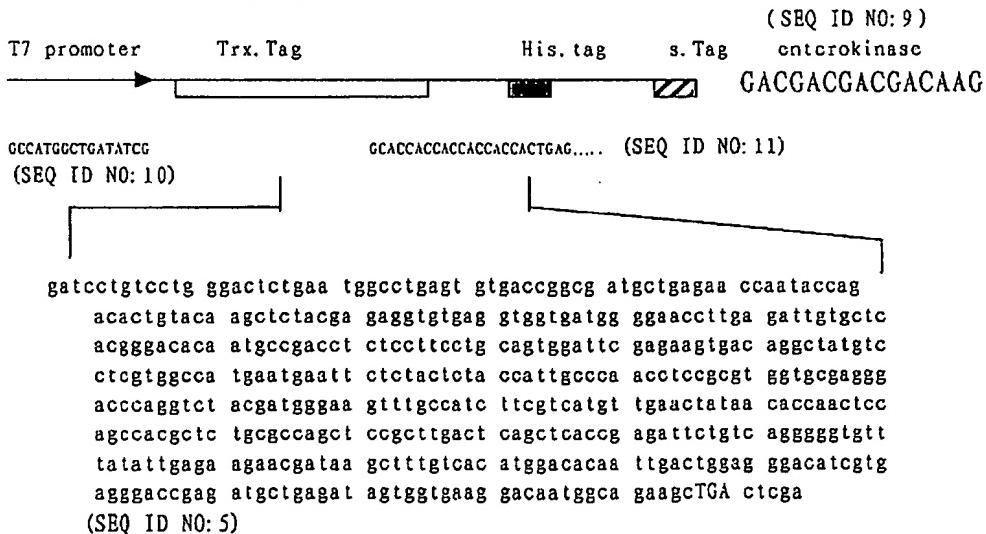


图 8 DE3-1 质粒构建酶切鉴定图

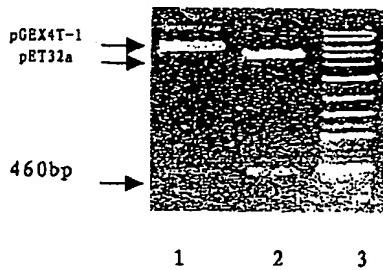


图 9 DE3-1 诱导表达

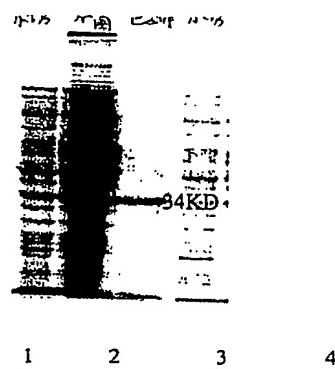


图 10 DE3-1 蛋白纯化

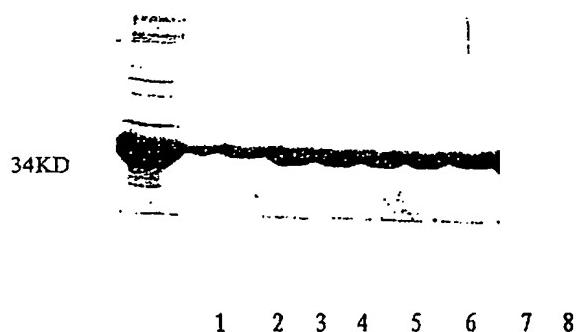


图 11 DE3-1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 3)

1 MRANDALQVL GLLFSLARGS EVGNSQAVCP GTLNGLSVTG DAENQYQTLY KLYERCEVVM
 61 GNLEIVLTGH NADLSFLQWI REVTCYVLVA MNEFSTLPLP NLRVVRGTQV YDGKFAIFVM
 121 LNYNTNSSHA LRQLRLTQLT EILSGGVYIE KNDKLCHMDT IDWRDIVERDR DAEIVVKDNG
 181 RSCPPCHEVC

图 12 不同疫苗对 FVB/N 转基因小鼠的发病率的影响
B3 及 DE3-1 疫苗对 FVB/N 转基因小鼠的发病率的影响

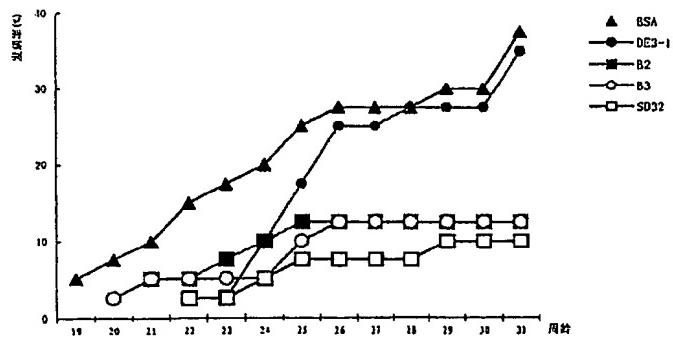


图 13

不同药物对小鼠肿瘤生长的影响(5周)

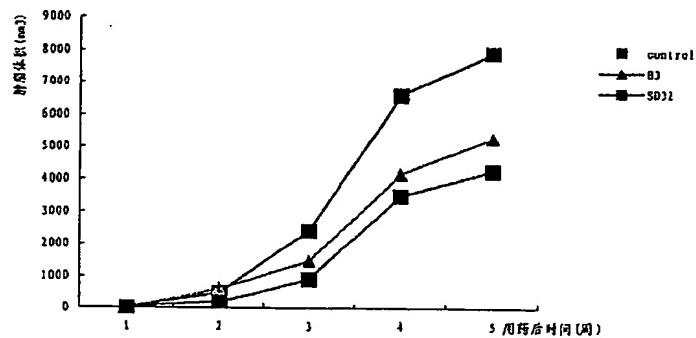


图 14

不同药物对肿瘤生长的抑制率(5周)

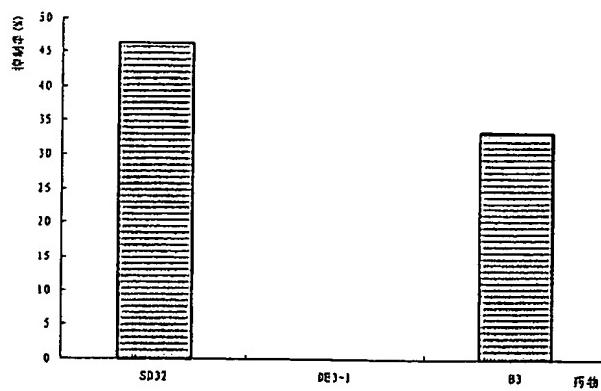


图 15

DE3-1 对小鼠乳腺癌生长的影响 (5周)

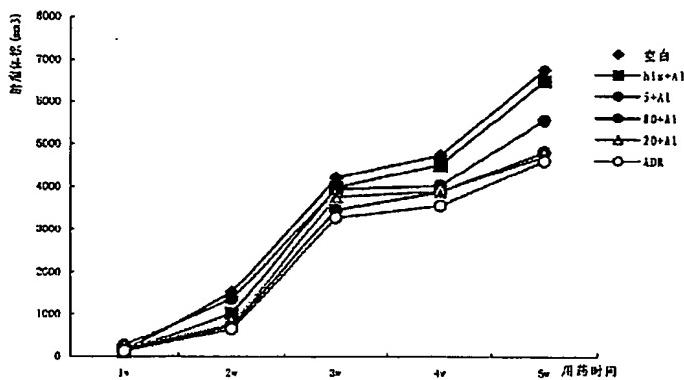
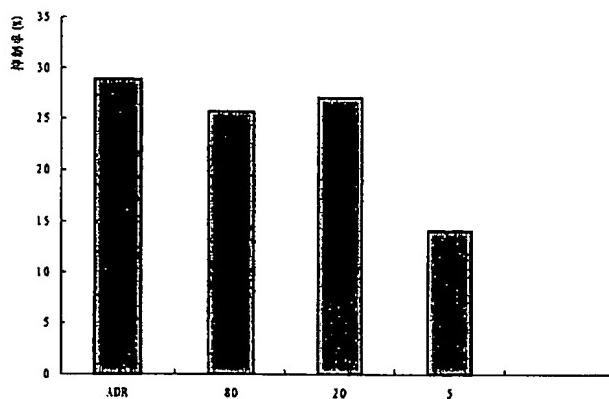


图 16

DE3-1 对肿瘤生长的抑制率 (5周)



47

图 17

B2 和 B3 交叉免疫原性实验 (B3 蛋白包被)

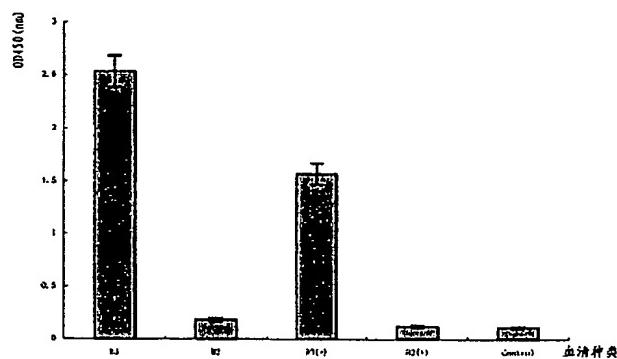


图 18

B2 和 B3 交叉免疫原性实验 (B2 蛋白包被)

